

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 1 月 29 日 (29.01.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/009065 A1

- (51) 国際特許分類: **A61K 31/085**, 31/341, 35/78, A61P 1/16, 3/10, 35/00, C07D 307/12
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/009370
- (22) 国際出願日: 2003 年 7 月 23 日 (23.07.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-214694 2002 年 7 月 24 日 (24.07.2002) JP
特願2003-119178 2003 年 4 月 24 日 (24.04.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社紅豆杉 (KOTOSUGI INC.) [JP/JP]; 〒229-1101 神奈川県 相模原市 相原 5-3 森ビル Kanagawa (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 門田 重利 (KADOTA, Shigetoshi) [JP/JP]; 〒930-0882 富山県 富山市 五艘 1 3 5 7-1 7 Toyama (JP). 信川 高寛 (NOBUKAWA, Takahiro) [JP/JP]; 〒229-1101 神奈川県 相模原市 相原 5-3 森ビル 株式会社紅豆杉内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 藤原 道彦 (FUJIWARA, Michihiko); 〒611-0021 京都府 宇治市 宇治蛇塚 4 9 番地の 3 1 Kyoto (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 規則4.17に規定する申立て:
— すべての指定国のための先の出願に基づく優先権を主張する出願人の資格に関する申立て(規則4.17(iii))
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: HYPOGLYCEMIC AGENT, LIVER PROTECTING AGENT AND ANTICANCER AGENT CONTAINING LIGNANS ORIGINATING IN HONGDOUSHAN

(54) 発明の名称: 紅豆杉由来リグナン類を含む血糖降下剤、肝臓保護薬、抗ガン剤

(57) Abstract: Drugs containing taxiresinol, (7' R)-7' -hydroxylariciresinol, secoisolariciresinol and isotaxiresinol, which are lignans contained in hongdoushan, as the active ingredients. Drugs containing an extract, which is obtained by extracting a hongdoushan plant with water and further extracting the obtained extract with an organic solvent, as the active ingredient. These drugs are useful particularly as a hypoglycemic agent, a liver protecting agent and an anticancer agent.

(57) 要約: 紅豆杉に含まれるリグナン類である、タキシレシノール(Taxiresinol)、ヒドロキシラリシレシノール((7'R)-7'-Hydroxylariciresinol)、セコイソラリシレシノール(Secoisolariciresinol)、イソタキシレシノール(Isotaxiresinol)を有効成分とする医薬である。また、紅豆杉の植物体を水で抽出し、得られた水抽出物を有機溶媒により抽出して得られる抽出物を有効成分とする医薬である。これらは、特に、血糖降下剤、肝臓保護薬、抗ガン剤として有用である。



WO 2004/009065 A1

明 細 書

紅豆杉由来リグナン類を含む血糖降下剤、肝臓保護薬、抗ガン剤

5 技術分野

本発明は、リグナン類化合物を含む医薬、特に血糖降下剤、肝臓保護薬、抗ガン剤に関するものである。

背景技術

10 真性糖尿病は炭化水素、脂質、及びタンパク質の代謝障害である。世界中の約 10 % の人々が真性糖尿病を発症しているとの報告もある。糖尿病に対して、インシュリンや様々な副作用を伴ういくつかの血糖降下剤を除いてほかに有効な薬剤は依然として現れていない。

また、肝臓は自然治癒力が強く少々の障害では表立った症状が表れないことから「沈黙の臓器」とも呼ばれ、物質代謝、血糖の調節、解毒、胆汁循環の調節、栄養素の貯蔵等、人の生命の維持に不可欠な機能を担っている。肝機能障害の病因、病態は多種多様であるが、治療薬の開発が最も求められているのは医療ニーズの高い慢性活動性肝炎である。本疾患を標的として肝保護薬をはじめ原因療法としての抗ウイルス剤や免疫調節薬など治療薬の研究が行われている。

20 さらに、抗ガン剤は現在約 60 知られていて、約 40 が臨床に使用されている。にもかかわらず、ガンは人の死亡原因の上位にあり、新たな医薬の開発が待たれている。

一方、中国雲南省の高山地帯などに生息している常緑樹木である紅豆杉（学名 *Taxus yunnanensis*）は、消炎、利尿、血圧降下、血中脂質減少などに効果のある薬用植物として知られている。また、紅豆杉の植物体には抗ガン剤であるパクリタキセル（タキソール）が含まれていることが確認されている。

このような薬効に着目して、特開平 10-120582 には紅豆杉の幹部を粉碎した樹木茶が開示されている。また、特開 2000-236835、特開 2000-236836 には、紅豆杉の幹の粉碎

物と、特定の薬用植物を混合した食品が開示されている。

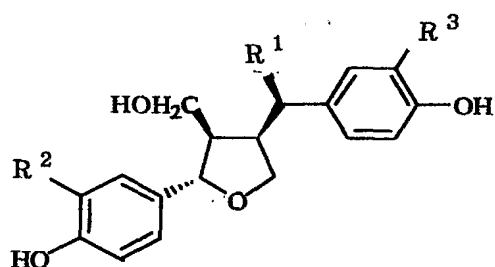
そして、中国政府が、近年、日本とアメリカ合衆国向けに、限定的な紅豆杉の輸出を許可したこともあり、紅豆杉の成分と薬理作用の研究が進みつつある。

本発明の目的は、紅豆杉に含まれる成分について未知の生物活性を見出し、当該活性
5 に基づく当該成分の新規医薬用途を提供することである。また、本発明の目的は、紅豆杉の抽出画分についての新規医薬用途を提供することである。

発明の開示

本発明の発明者は、紅豆杉に含まれるリグナン類化合物が、インビトロ・インビボに
10 において生物活性を示すことを見出し、本発明を完成した。

すなわち本発明は、式(1)

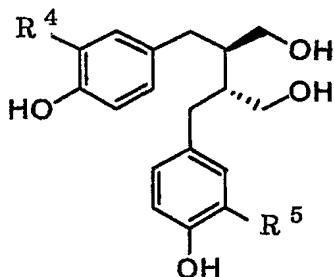


(1)

(式中R¹は水素または水酸基、R²は炭素数1～4のアルキルオキシ基または水酸基、
R³は炭素数1～4のアルキルオキシ基を表す)

15 で示される化合物、または式(1)化合物の医学的に許容される塩またはエステルを有効成分とする医薬である。

また、本発明は、式(2)

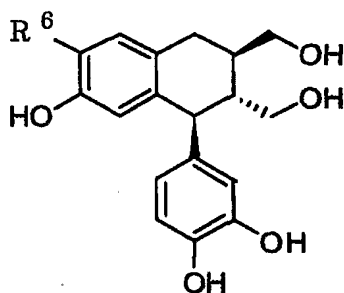


(2)

(式中 R^4 、 R^5 は炭素数 1～4 のアルキルオキシ基を表す)

で示される化合物、または式 (2) 化合物の医学的に許容される塩またはエステルを有効成分とする医薬である。

さらに、本発明は、式 (3)



(3)

(式中 R^6 は炭素数 1～4 のアルキルオキシ基を表す)

で示される化合物、または式 (3) 化合物の医学的に許容される塩またはエステルを有効成分とする医薬である。

本発明の 1 の実施態様において、請求の範囲第 1 項記載の医薬は、血糖降下剤、肝臓保護薬または抗ガン剤であることを特徴とする。

本発明の他の実施態様において、請求の範囲第 2 項記載の医薬は、血糖降下剤、肝臓保護薬または抗ガン剤であることを特徴とする。

本発明の更なる他の実施態様において、請求の範囲第 3 項記載の医薬は、血糖降下剤、肝臓保護薬または抗ガン剤であることを特徴とする。

本発明においてエステルとは、式 (1)、式 (2)、式 (3) 中のメチロール基 (CH_2OH) の水酸基が有機酸または無機酸と結合し、水分子が脱離した化合物を意味する。式 (2)、式 (3) の化合物においては、一分子中にメチロール基が 2 つあり、その一方のみがエステル化されてもよく、また、両者がエステル化されてもよい。医学的に許容されるエステルは、医学・薬学の分野で公知のものが制限なく使用できる。例えば、有機酸として酢酸、無機酸としてリン酸が使用できる。

塩は、無機及び有機の塩基から誘導されるいかなる塩でもよく、化合物中のフェノール基がフェノキシドイオン (phenoxide ion) 基となる塩及び／またはメチロール基がメ

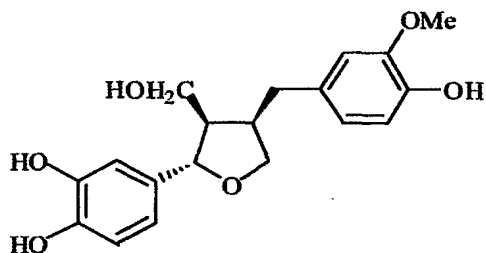
チロキシドイオン(methyloxide ion)基となる塩を含む。医学的に許容される塩は、医学・薬学の分野で公知のものが制限なく使用できる。例えば、アルカリ金属、アルカリ土類金属、アミンの塩が使用出来る。

さらに本発明は、紅豆杉の植物体を水で抽出し、得られた水抽出物を有機溶媒により抽出して得られる抽出物を有効成分とする医薬である。

本発明の好ましい実施態様にあつては、請求の範囲第7項記載の医薬は、血糖降下剤、肝臓保護薬または抗ガン剤であることを特徴とする。

本発明において血糖値降下剤とは、糖尿病の治療・予防に用いる薬剤を、また、肝臓保護薬とは、肝臓機能の回復、保全に用いる薬剤を、さらに、抗ガン剤とは、ガンの治療・予防・再発防止に用いる薬剤を意味する。

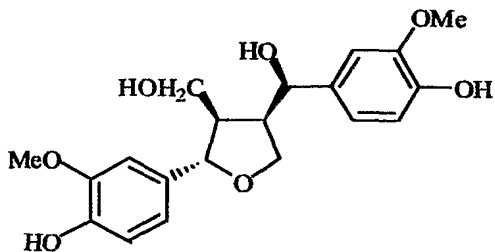
式(1)の化合物において、 R^1 がH、 R^2 がOH、 R^3 が CH_3O であるとき、すなわち式(4)



(4)

の化合物はタキシレシノール (Taxiresinol) (以下TAXという) である。

式(1)の化合物において、 R^1 がOH、 R^2 が CH_3O 、 R^3 が CH_3O であるとき、すなわち式(5)

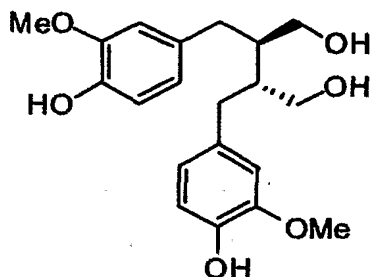


(5)

の化合物は(7^R)-7^R-ヒドロキシラリシレシノール

((7^R)-7^R-Hydroxylariciresinol) (以下HYLという) である。

式(2)の化合物において、 R^4 が CH_3O 、 R^5 が CH_3O であるとき、すなわち式(6)

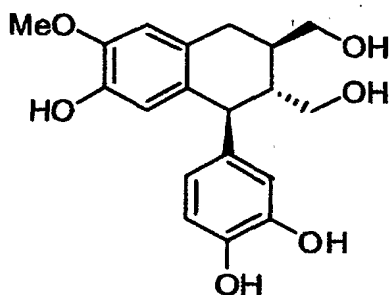


(6)

の化合物はセコイソラリシレシノール(Secoisolariciresinol) (以下S I Lと記す) で

5 ある。

式(3)の化合物において、 R^6 が CH_3O であるとき、すなわち式(7)



(7)

の化合物はイソタキシレシノール(Isotaxiresinol) (以下I T Xと記す) である。

10 TAX、HYL、S I L、I T Xは紅豆杉の植物体(葉、樹皮、材部、芯部、根など)に含まれており、次のようにして抽出、単離することができる。まず、植物体を熱水抽出し水抽出物を得る。次に、その水抽出物を有機溶媒(例えば酢酸エチル)で抽出し有機溶媒画分を得る。さらに、その有機溶媒画分からクロマトグラフィー(カラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、H P L Cなど)を用いてこれら化合物を単離する。

15 さらに、これら化合物から有機合成により、式(1)、式(2)、式(3)の化合物を合成することが出来る。

TAXのメトキシ基(CH_3O)は、エトキシ基(C_2H_5O)、プロピオキシ基(C

- $_3\text{H}_7\text{O}$)、ブチロキシ基 ($\text{C}_4\text{H}_9\text{O}$) に置換されても良い。HYLの2つのメトキシ基は、各々がエトキシ基、プロピオキシ基、ブチロキシ基に置換されても良く、また、2つのアルキルオキシ基は同一でも良く、異なっているても良い。SILの2つのメトキシ基は、各々がエトキシ基、プロピオキシ基、ブチロキシ基に置換されても良く、また、
- 5 2つのアルキルオキシ基は同一でも良く、異なっているても良い。ITXのメトキシ基は、エトキシ基、プロピオキシ基、ブチロキシ基に置換されても良い。

本発明にかかる紅豆杉の水抽出物の有機溶媒抽出物を得るには、まず、紅豆杉の植物体(葉、樹皮、材部、芯部、根など)を水で抽出し水抽出液を得る。植物体として材部と樹皮(あわせて木部という)を使用することが好ましい。水抽出は、熱水抽出とすることが好ましい。抽出操作のより具体的な一実施態様は、例えば、植物体粉碎物と、当該粉碎物の約2倍から20倍量の純水を混合(植物体粉碎物1kgに対し純水2Lから、

10 20L)し、室温又は加熱下、好ましくは加熱下、より好ましくは100℃で、1分～2時間、好ましくは20分～1時間抽出し、濾過または遠心分離により、上清を回収する方法が挙げられる。

- 15 次に、その水抽出液を有機溶媒で抽出し有機溶媒抽出液を得る。抽出前に水抽出液を減圧濃縮などにより減容してもよい。また、水抽出液に無機塩を溶解させた後に、有機溶媒で抽出してもよい。有機溶媒としては、水溶液から化合物を抽出する場合に、通常用いられる有機溶媒を使用することが出来、例えば、酢酸エチル、アルコール類、エーテル類、脂肪族炭化水素類、芳香族炭化水素類(ベンゼン、トルエンなど)、ピリジン
- 20 などが使用できる。好ましい有機溶媒は極性を有するものであり、例えば分子内に酸素原子、窒素原子を有する有機溶媒であり、もっとも好ましくは酢酸エチル、ジエチルエーテルである。続いて、定法に従い、有機溶媒抽出液から有機溶媒を除去し、有機溶媒抽出物を得る。

- 本発明にかかる医薬は経口、非経口、又は経皮投与することができる。投与形態は、
- 25 通常医薬の投与に用いられる形態が制限なく使用可能であり、例えば錠剤もしくは被覆錠、カプセル、溶液、シロップ、粉末、座薬が挙げられる。

錠剤は化合物または抽出物を、賦形剤(乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニットなど)、

崩壊剤（コーンスターチ、アルギン酸など）、結合剤（スターチ、ゼラチンなど）、滑沢剤（ステアリン酸マグネシウム、タルクなど）および／または遅延放出を与える剤（カルボキシメチルセルロース、セルロースアセテートフタレート、ポリビニルアルコールなど）を混合することにより製造できる。錠剤はいくつかの層からなっているもよい。

- 5 被覆錠は錠剤と同様にして製造した芯を錠剤被覆に通常用いられる物質、例えばコリドン(collidone)、シェラック(shellac)、アラビアゴム、タルク、二酸化チタン、ショ糖などで被覆することにより製造できる。遅延放出を得るべく芯はいくつかの層からなっているもよく、また錠剤についての上記賦形剤を用いることができる。

- 10 液剤、シロップの剤型にするには、リグナン類化合物に、水、糖類（エリスリトール、キシリトール、マンニトール、ショ糖、トレハロース、マルトース、フラクトース、ソルビット、蜂蜜など）、防腐剤（パラベンなど）、各種香料、着色料、油類（大豆油など）を適宜添加、混合して調製することができる。

- 15 本発明にかかる医薬を含有するカプセルは、化合物または抽出物をゼラチンカプセルに封入し、または、化合物または抽出物と例えばラクトース、ソルビトールなどの不活性担体を混合し、混合物をゼラチンカプセルに封入、またはゼラチン膜で被包成形して製造することができる。

本発明に係る化合物または抽出物の投与量は、通常、 $1\text{ mg} \sim 1000\text{ mg}/\text{人}/\text{日}$ である。しかしながら、最初に少量を投与し、次いで、意図した効果が達成されるまで増量することにより、適当な投与量を決定することも意図されている。

- 20 本リグナン類は、従来から安全に摂取されている薬用植物である紅豆杉の成分であり、安全な物質である。

本発明により様々な疾病治療や健康増進に有用な新規な医薬を得ることができる。特に、血糖降下剤、肝臓保護薬または抗ガン剤として有用な医薬を得ることができる。

- 25 図面の簡単な説明

第1図は、紅豆杉木部からの成分の抽出・分画過程の説明図である。

第2図は、ラットを用いたS I Lの血糖値降下作用の試験結果を示すグラフであり、

第3図は、ラットを用いたITXの血糖値降下作用の試験結果を示すグラフである。

第4図は、TAX、HYL投与マウス血清中のアミノ基転移酵素量の測定結果を示すグラフであり、第5図は、SIL、ITX投与マウス血清中のアミノ基転移酵素量の測定結果を示すグラフであり、第6図は、酢酸エチル可溶画分投与マウス血清中のアミノ基転移酵素量の測定結果を示すグラフである。

第7図は、TAX、HYL投与マウス血清中のTNF- α の測定結果を示すグラフであり、第8図は、SIL、ITX投与マウス血清中のTNF- α の測定結果を示すグラフである。

第9図は、培養肝細胞死に対する、TAX、HYLの抑制活性測定結果を示すグラフであり、第10図は、培養肝細胞死に対するSIL、ITXの抑制活性測定結果を示すグラフである。

(符号の説明)

TAX タキシレシノール (Taxiresinol)

15 HYL (7'R)-7'-ヒドロキシラリシレシノール ((7'R)-7'-Hydroxylariciresinol)

SIL セコイソラリシレシノール (Secoisolariciresinol)

ITX イソタキシレシノール (Isotaxiresinol)

SI シリマリン (Silymarin)

20 発明を実施するための最良の形態

以下に実施例により本発明をさらに説明する。この発明の実施例に記載されている原材料、化合物の抽出法などは、この発明の範囲をそれらのみに限定する趣旨のものではなく、単なる説明例にすぎない。

25 (単離)

紅豆杉の材部及び樹皮(合わせて木部)を粉碎機で粉碎し、30メッシュパスの粉末を得た。この粉末を乾燥した。乾燥粉末850gを4Lの純水で45分間還流抽出した。濾

過後、残渣に 4L の純水を加えて 4 5 分間還流抽出した。さらに同じ還流抽出操作を 1 回繰り返した。3 回の水抽出液を合わせて減圧濃縮し、水抽出物 5 2. 5 g を得た。

次に、水抽出物 5 2. 5 g を 500mL の酢酸エチルで抽出し、酢酸エチル層を分離した。分離後、残渣に 500mL の酢酸エチルを加えて抽出した。さらに同じ抽出操作を 1 回繰り返した。3 回の抽出操作で得た酢酸エチル層を合わせて減圧濃縮し、酢酸エチル画分 3 4. 1 g を得た。

続いて、シリカゲルカラム（内径 3.5cm、長さ 60cm、充填物：Silica gel 60（ナカライテスク株式会社）に前記酢酸エチル画分 3 4. 1 g を添加し、クロロホルムにメタノールを添加した溶媒を使用して、溶出操作を行い 500mL 毎の 9 画分を得た。溶媒の組成と、各画分液体を減圧濃縮して得た流出物の重量、画分中に含まれる成分を表 1 に示した。

表 1

紅豆杉水抽出物の酢酸エチル可溶画分のカラムクロマトグラフィー

画分 番号	溶媒の組成 (※ 1) MeOH %	重量 g	成分
1	0	0. 3 1	
2	0	0. 3 0	
3	1	0. 3 0	
4	1～5 (※ 2)	2. 7 8	S I L
5	5	1. 6 8	S I L、T A X、 H Y L
6	1 0	1 2. 5	
7	1 0～2 0 (※ 3)	7. 8 4	I T X
8	2 0	1. 4 1	
9	3 0	1. 0 0	

(※ 1) 溶媒はクロロホルムとメタノールの混合液であり、
表中の値はメタノールの混合百分率を示す

(※ 2) 1%:100mL、2%:100mL、3%:100mL、4%:100mL、5%:100mL
による溶出物を混合した画分

(※ 3) 12%:100mL、14%:100mL、16%:100mL、18%:100mL、20%:100mL
による溶出物を混合した画分

第5画分の溶出溶液を減圧濃縮後に、結晶化したS I L (840 mg)を得た。続いて、その残渣を分取薄層クロマトグラフィーにより分離した。薄層板はKieselgel 60 F 254 厚さ0.5mm (メルク社)を使用し、展開溶媒はメタノール：クロロホルム／10：90溶液を使用した。R_f値は、TAX：0.25、HYL：0.21であった。また、
5 同条件でS I LのR_f値は0.36であった。分取の結果、TAX (38.9 mg)、HYL (10.2 mg)を得た。

TAX、HYL、S I L、I T Xの構造式は、分光学的および化学的な分析に基づき、決定、確認した。以下に、主要な分析データを記述する。

TAX(Taxiresinol)：淡褐色無定形固体(light brown amorphous solid)

10 ¹H NMR (CD₃OD) δ 6.76 (1H, d, *J* = 2.0, Hz, H-2), 6.76 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2'), 6.71 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5), 6.69 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5'), 6.63 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.0 Hz, H-6'), 6.61 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.0 Hz, H-6), 4.66 (1H, d, *J* = 6.9 Hz, H-7'), 3.93 (1H, dd, *J* = 6.4, 8.3 Hz, H-9'), 3.80 (3H, s, H-OMe), 3.78 (1H, dd, *J* = 8.0, 10.5 Hz, H-9'), 3.68 (1H, dd, *J* = 5.9, 8.3 Hz, H-9'), 3.60 (1H, dd, *J* = 6.4, 10.5 Hz, H-9'), 2.90 (1H, dd, *J* = 4.6, 13.4 Hz., H-7), 2.70 (1H, m, H-8),
15 2.45 (1H, dd, *J* = 11.5, 13.4 Hz, H-7), 2.35 (1H, m, H-8');

¹³C NMR (CD₃OD) δ 148.9 (C-3'), 146.3 (C-3), 145.7 (C-4'), 145.7 (C-4), 135.8 (C-1'), 133.5 (C-1), 122.1 (C-6), 118.6 (C-6'), 116.1 (C-5), 116.1 (C-5'), 114.1 (C-2'), 113.4 (C-2), 83.9 (C-7'), 73.4 (C-9), 60.4 (C-9'), 56.3 (C-OMe), 54.0
20 (C-8'), 43.8 (C-8), 33.6 (C-7).

$[\alpha]_D^{25} +23.0^\circ$ (c=0.32 in Ethanol)

HYL((7'R)-7'-Hydroxylariciresinol)：無色無定形固体(colorless amorphous solid)

25 ¹H NMR (CD₃OD) δ 6.91 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2), 6.86 (1H, d, H-2'), 6.79 (1H, dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz, H-6), 6.74 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5), 6.73 (2H, m, H-5' and H-6'), 4.61 (1H, d, *J* = 7.3 Hz, H-7), 4.47 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-7'), 4.23 (1H, dd, *J* = 9.0, 4.4 Hz, H-9'), 3.93 (1H, dd, *J* = 9.0, 7.8 Hz, H-9'), 3.84 (3H, s,

H-OMe), 3.82 (3H, s, H-OMe), 3.21 (1H, dd, $J = 10.9, 5.9$ Hz, H-9), 3.30 (1H, dd, $J = 10.9, 4.6$ Hz, H-9), 2.54 (1H, m, H-8'), 1.88 (1H, m, H-8);

^{13}C NMR (CD_3OD) δ 148.9 (C-3), 148.9 (C-3'), 147.1 (C-4), 147.1 (C-4'), 136.1 (C-1'), 134.7 (C-1), 120.7 (C-6'), 120.2 (C-6), 115.9 (C-5'), 115.9 (C-5), 111.5 (C-2'), 111.0 (C-2), 85.0 (C-7), 76.6 (C-7'), 71.4 (C-9'), 62.2 (C-9), 56.4 (C-OMe), 56.3 (C-OMe), 53.3 (C-8), 50.7 (C-8').

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} +4.6^\circ$ (c=0.18 in Methanol)

S I L (Secoisolariciresinol) : 無色結晶(colorless crystal)

^1H NMR (CD_3OD), δ 6.66 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 6.58 (2H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 6.53 (2H, dd, $J = 2.0, 8.0$ Hz, H-6), 3.71 (3H, s, H-OMe); 3.53 (4H, d, $J = 4.3$ Hz, H-9), 2.56 (2H, dd, $J = 7.3, 13.7$ Hz, H-7), 2.52 (2H, dd, $J = 7.7, 13.7$ Hz, H-7), 1.88 (2H, m, H-8);

^{13}C NMR (CD_3OD) δ 148.6 (C-3), 145.3 (C-4), 133.7 (C-1), 122.6 (C-6), 113.3 (C-2), 115.7 (C-5), 61.9 (C-9), 56.1 (C-OMe), 44.0 (C-8), 36.0 (C-7)

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} -32.0^\circ$ (c=0.1 in Acetone)

I T X (Isotaxiresinol) : 無色無定形固体(colorless amorphous solid)

^1H NMR (CD_3OD), δ 6.69 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 6.61 (1H, s, H-5), 6.52 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.50 (1H, dd, $J = 2.0, 8.0$ Hz, H-6'), 6.19 (1H, s, H-2), 4.67 (2H, m, H-9), 4.67 (1H, m, H-9'), 4.66 (1H, d, $J = 6.9$ Hz, H-7'), 3.77 (3H, s, H-OMe), 3.40 (1H, dd, $J = 4.3, 11.1$ Hz, H-9'), 2.73 (1H, br d, $J = 6.8$ Hz, H-7), 1.97 (1H, m, H-8), 1.71 (1H, m, H-8')

^{13}C NMR (CD_3OD) δ 147.1 (C-3), 146.2 (C-3'), 145.2 (C-4), 144.6 (C-4'), 138.7 (C-1'), 134.3 (C-1), 128.9 (C-6), 122.0 (C-6'), 117.4 (C-2), 117.3 (C-2'), 116.1 (C-5'), 112.3 (C-5), 66.0 (C-9), 62.4 (C-9'), 56.4 (C-OMe), 48.1 (C-8'), 47.8 (C-7'), 40.1 (C-8), 33.5 (C-7)

$[\alpha]_D^{25} +47.3^\circ$ (c=0.4 in Ethanol)

決定した T A X、S I L の構造式は、Mujumdar, R.B.; Srinivasan, R. & Venkataraman, K., Taxiresinol, A New Lignan in the Heartwood of *Taxus baccata*; Indian J. Chem., 40, 677-680(1972) に記載された構造式と一致した。H Y L の構造式は、Barrero, A.F.; Haidour, A.; Dorado, M.M.; Gravalos, D. & Quesada, T.G., Lignans from the wood of *Abies pinsapo*; J. Nat. Prod., 57, 713-719(1994) に記載された構造式と一致した。I T X の構造式は、King, F.E.; L.Jurd & King, T.J., isoTaxiresinol (3'-Dimethylisolariciresinol), A New Lignan extracted from the Heartwood of the English Yew, *Taxus baccata*; J. Chem. Soc., 17-24(1952) に記載された構造式と一致した。

(抽出・分画)

第 1 図を参照して、紅豆杉木部からの成分の抽出・分画操作を説明する。

15 紅豆杉の乾燥木部粉末(30メッシュパス)850gを4Lの水で45分間還流抽出した。濾過後、残渣に4Lの水を加えて45分間還流抽出した。さらに同じ還流抽出操作を1回繰り返した。3回の水抽出液を合わせて減圧濃縮し、水抽出物52.5gを得た。

次に、水抽出物52.5gを500mLの酢酸エチルで抽出し酢酸エチル層を分離した。分離後、残渣に500mLの酢酸エチルを加えて抽出した。さらに同じ抽出操作を1回繰り返した。3回の抽出操作で得た酢酸エチル層を合わせて減圧濃縮し、酢酸エチル画分34.1gを得た。

残渣である水溶液を減圧濃縮し、酢酸エチル不溶画分16.1gを得た。

前記水抽出物を抽出後の残渣(木部粉末)に、メタノールと水(1対1)の混合液4Lを加え45分間還流抽出した。濾過後、同じの還流抽出操作を2回繰り返した。325 回の抽出液を合わせて減圧濃縮し、メタノール/水抽出物32.3gを得た。

続いて、残渣(木部粉末)にメタノール4Lを加え45分間還流抽出した。濾過後、同じの還流抽出操作を2回繰り返した。3回の抽出液を合わせて減圧濃縮し、メタノール

ル抽出物 7.2 g を得た。

(試験例 1 - 血糖値降下活性)

ラットを用いて、リグナン類化合物と紅豆杉画分の血糖値降下活性を試験した。

5 血中グルコース濃度は、採血した全血を血球分離し血清を用いて測定した。試薬はグルコース C I I - テストワコー (和光純薬工業株式会社) を使用し、吸光度測定には UV-160A (株式会社島津製作所) を使用した。

5-6 週齢、体重 180-200 g の雄性ウイスターラットを 16 時間絶食した後、ストレプトゾシン (以下 STZ と記す) (55mg/kg (ラットの体重)) のクエン酸緩衝液 (pH4.2) を腹腔内に注射した。STZ を注射した後、5 日後に尾静脈より採血し血中グルコース濃度を測定した。そして、血中グルコース濃度が 250mg/dL 以上のラットを糖尿ラットとして試験に用いた。

15 糖尿ラットに化合物または画分を 100mg/kg (ラットの体重) の量で、12 時間間隔で 5 回注射により腹腔内投与し、その後尾静脈より採血し血中グルコース濃度を測定した。試験は 4 匹のラットを 1 群として行い、測定値の平均値と標準偏差を算出した。ネガティブコントロール (対照) として生理食塩水を投与した群を設けた。ポジティブコントロールとして、前記糖尿ラットにトリブタミド (tolbutamide) 200mg/kg (ラットの体重) とブホルミン (buformin) 1mg/kg (ラットの体重) の混合物を同様に腹腔内投与した群を設けた。

20 S I L の試験結果を図 2 に示す。各グラフは平均値と標準偏差の値を表示し、また、*印は、スチューデントの t 検定 (Student's t-test) の結果、* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ で Control 群との間の有意差があることを示す。グラフの表示と t 検定結果の表示は、第 3 図～第 10 図についても同様である。

25 S I L は血糖値を 33.4% 減少した。これは血糖値を 24.0% 減少した陽性コントロールと同等の効果であった。

I T X の試験結果を図 3 に示す。I T X は血糖値を 23.6% 減少した。これは血糖値を 24% 減少した陽性コントロールと同等の効果であった。

TAXおよび紅豆杉画分の試験結果を表2に示す。

表2

STZ誘発糖尿ラットに対するTAXと紅豆杉画分の血糖降下作用

グループ	血中グルコース濃度(mg/dL)		減少率(%)
	投与前	投与後	
ノーマル	111.3±13.2	106.1±12.7	
ネガティブコントロール	402.3±11.4	364.4±13.0	
ポジティブコントロール	339.8±23.5	258.2±27.6	24
TAX	316.1±19.9	250.2±35.5	20.9
水抽出物	385.7±12.8	255.6±39.1	33.7
メタノール抽出物	328.1±10.0	350.6±25.0	-6.9
酢酸エチル可溶画分	419.2±10.7	368.2±10.4	12.1
酢酸エチル不溶画分	449.6±36.2	392.8±19.6	12.6

TAXは血糖値を20.9%減少した。これは血糖値を24%減少した陽性コントロールと同等の効果であった。

また、酢酸エチル可溶画分は、血糖値を12.1%減少した。

(試験例2－肝臓保護活性)

リグナン類化合物及び紅豆杉画分の肝障害に対する予防、治療活性を以下の方法により試験した。

(D-ガラクトサミン(D-galactosamine:以下D-GalNと略す)／リポポリサッカライド(Lipopolysaccharide:以下LPSと略す)誘発肝障害モデル(J. Wang et al., Biochem. Pharm., 39, 267(1990)、A. Wendel et al., Biochem. Pharm., 35, 2115(1986))による評価)

12時間絶食したddY系雄性マウス(6週齢)の腹腔内にD-GalN(700mg/kg)／LPS(10μg/kg)を注射して肝障害を惹起した。被検薬はD-GalN／LPSを注射する前の12時間及び1時間前に計2回皮下投与した。2群の被検薬投与群を設け、1群は被検薬投与量50mg/kg(マウス体重)とし、他群は被検薬投与量10mg/kg(マウス体重)とした。対照群(Control)には生理食塩水を同様に投与した。また、薬効比較のために既

存の肝臓保護薬であるシリマリン(silymarin)投与群(皮下投与:100mg/kg)を設けた。D-GalN/LPS注射の90分後に血中の腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor alpha)(以下TNF- α と略す)の値を測定した。また、8時間後に血中のアミノ基転移酵素(GPT(glutamic pyruvic transaminase)とGOT(glutamic oxaloacetic transaminase))の値を測定した。

TNF- α はTNF- α 抗体(anti-mouse TNF- α antibody)(Endogen, Inc., USA)を用いるELISA法によって測定した。GPT、GOTはTransaminase CII-Test kit(和光純薬工業株式会社)を用いて測定した。

本障害モデルにおいて誘発される肝障害機構は、免疫担当細胞の活性化、肝組織への浸潤、ロイコトリエンD4やTNF- α 等のオートコイド、サイトカインの分泌、肝細胞のアポトーシスなど一連の過程を経由するため、免疫学的肝障害発生のモデルとして臨床成績との相関性が高いと考えられる。

アミノ基転移酵素量の測定結果を第4図と第5図に示す。グラフの縦軸は血清中のアミノ基転移酵素量をIU/Lで示す。NormalはD-GalN/LPS非処理群を表す。Controlは生理食塩水を投与した群を表す。TAX50~ITX10はリグナン類の化合物名と投与量を表す。SIはシリマリン投与群を表す。Normal群のマウス個体数は3であり、その他の実験群のマウス個体数は6である。

TAX、HYL、SIL、ITXは、10mg/kgと50mg/kgの投与量で、血清中GPTとGOT上昇を抑制し、用量依存的かつ有意義な肝障害抑制作用を示した。

第6図に、紅豆杉の酢酸エチル可溶画分(グラフ中にSoと記載)を投与したアミノ基転移酵素量の測定結果を示す。酢酸エチル可溶画分は、リグナン類化合物と同様に、血清中GPTとGOT上昇を抑制し、用量依存的かつ有意義な肝障害抑制作用を示した。

TNF- α の測定結果を第7図と第8図に示す。グラフの縦軸は血清中のTNF- α 量をpg/mLの単位で示す。Controlは生理食塩水を投与した群を表す。TAX50~ITX10はリグナン類の化合物名と投与量を表す。SIはシリマリン投与群を表す。各実験群のマウス個体数は6である。また、D-GalN/LPS非処理群(マウス個体数:3)の血清TNF- α 量は検出限界(10pg/mL)以下であったため、図示していない。

TAX、HYL、SIL、ITXは、10mg/kg と 50mg/kg の投与量で、血清中 TNF- α 上昇を抑制し、用量依存的かつ有意義な肝障害抑制作用を示した。

また、SIL、ITXを投与したマウスおよび対照群のマウスについて、D-GalN/LPS 注射の8時間後に肝臓細胞の病理組織学的観察を行った。対照群のマウスについては、細胞内のアポトーシス小体が多数観察され、また、細胞核内のクロマチンの凝縮が多数観察された。すなわち多数の細胞のアポトーシスが観察された。一方、SIL、ITXを投与したマウスでは、より少ない数の細胞内のアポトーシス小体、また、細胞核内のクロマチンの凝縮が観察された。よって、肝臓細胞の病理組織学的観察からもリグナン類化合物の肝障害抑制作用が裏付けられた。

(試験例3 - TNF- α 誘発マウス初代培養肝細胞死に対する抑制活性)

ddY系雄マウスの肝臓からコラゲナーゼ灌流法の変法で分離した肝実質細胞を、10%ウシ血清、ペニシリンG100IU/mL、ストレプトマイシン 100 μ g/mL、デキサメタゾン 100 μ M、インスリン 50ng/mL を補充したウィリアムスE(William's E)培地に懸濁し、96ウェルのプラスチックプレートに1ウェル当たり 1.5×10^4 セル(cell)を配布した。2時間予備培養した後、D-ガラクトサミン 0.5mM およびリグナン類を含む新鮮な培地に置き換えた。30分後、TNF- α 100ng/mL を加えた。18時間後、MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dimethyltetrazolium bromide)発色反応を用いて生存肝細胞数を計測した。

測定結果を第9図と第10図に示す。

グラフの縦軸は細胞生存割合を百分率で示す。Normal は TNF- α 非添加の培地中での細胞生存割合を示す。Control は被検薬非添加の培地中での細胞生存割合を示す。

TAX、HYL、SIL、ITXは培地中に 200, 100, 50, 10 μ M の濃度で添加した。それぞれの細胞生存割合を4本の棒グラフで示す。

TAXを培地に添加すると、肝細胞の生存割合は Control に比較して用量依存的、かつ有意義に上昇した。HYL、SIL、ITXを培地に添加した場合も、TAXの添加

と同様な試験結果が得られた。

(試験例 4 - 培養ガン細胞に対する細胞毒性活性)

ヒト HT-1080 繊維肉腫細胞とマウス腸癌 Colon26-L5 の 2 種のガン細胞を用いてリグ
5 ナン類化合物及び紅豆杉画分の細胞毒性活性試験を行った。ヒト HT-1080 繊維肉腫細胞
は 10%FCS (非働化したウシ胎児血清) と 0.1%炭酸水素ナトリウム及び 2mM グルタミン
を含んだ EMEM 培地で培養した。一方、マウス腸癌 Colon26-L5 細胞は、前記 EMEM 培地
と同様なサプリメントを含んだ RPMI 培地で培養した。細胞生存率は MTT
(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dimethyltetrazolium bromide)法によって決定
10 した。

指数関数的に増殖する細胞は 96 穴プレート中に、100 μ L 中に約 2000 細胞を含んで
いる細胞懸濁培地液として加え、培養した。

24 時間後、細胞がプレートに接着した後に、培地液を除去し、濃度の異なる被検薬
培地溶液 (100, 50, 10, 5, 1 μ g/mL) 100 μ L を加え、5%二酸化炭素雰囲気下 37°C で 72
15 時間培養した。被検薬は、まず DMSO に溶解し、その後培地で希釈して用いた。DMSO の
最終濃度は 0.25%以下になるように調整した。

その後、培地液を除去し、培地に溶解した MTT100 μ L を加え、3 時間培養し、形成さ
れたホルマザンの量をプレートリーダー (パーキンエルマー社 HTS-7000) を用いて、550nm
で吸光度を測定した。1 の濃度での試験は 4 穴で行い、4 測定値の平均値を試験結果と
20 した。そして、試験結果から IC₅₀ (50%有効濃度) 値を算出した。

試験結果を表 3 と表 4 に示す。

表 3

リグナン類化合物の細胞毒性活性

化合物	IC ₅₀ (μg/mL)	
	Colon 26-L5	HT-1080
TAX	35.2	62.2
HYL	>100	>100
SIL	60.2	5.9
ITX	36.5	43.8
5-Fluorouracil	0.07	0.29

S I LはHT-1080 細胞に対して顕著な細胞毒性を示した。T A X、I T XはHT-1080 と Colon26-L5 に対して細胞毒性を示した。

5 表 4

紅豆杉画分の細胞毒性活性

画分	IC ₅₀ (μg/mL)	
	Colon 26-L5	HT-1080
水抽出物	69.5	9.5
メタノール／水抽出物	8.2	<1.0
メタノール抽出物	15.3	<1.0
酢酸エチル可溶画分	8.7	2.6
酢酸エチル不溶画分	9.2	8.2

酢酸エチル可溶画分はHT-1080 と Colon26-L5 に対して細胞毒性を示した。

(試験例 5 - D P P Hフリーラジカル消去活性)

- 10 D P P H(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)エタノール溶液 (濃度 60 μM) 500 μL と、被検薬のエタノールあるいは水溶液 500 μL を混合し、室温で 30 分間放置後に 520nm で吸光度を測定した。試験は被検薬の濃度を変更して行い、その測定値から EC₅₀ (50% 有効濃度) 値を算出した。

測定結果を表 5 に示す。

表 5

紅豆杉画分のDPPHフリーラジカル消去活性

画分	ED ₅₀ (μg/mL)
水抽出物	8.7
メタノール／水抽出物	8.3
メタノール抽出物	9.9
酢酸エチル可溶画分	9.5
酢酸エチル不溶画分	18.1
Caffeic Acid	5.41

酢酸エチル可溶画分は、顕著なD D P Hフリーラジカル消去活性を示した。

フリーラジカル消去能は、抗酸化活性の一つである。フリーラジカル消去活性の強い物質は抗酸化活性が強いと考えられる。D-GalN/TNF- α 誘発肝障害に対する、酢酸エチル可溶画分の作用機序は、抗酸化活性による TNF- α 産生の抑制にあると考えられ、その結果肝細胞がアポトーシスになるのを抑制すると考えられる。

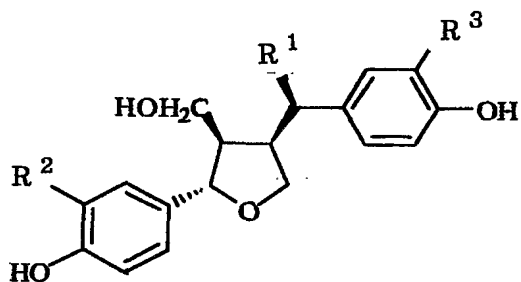
また、糖尿病によって引き起こされる白内障などの合併症に抗酸化物質が有効であるとの報告がなされている。本発明にかかる酢酸エチル可溶画分とリグナン類は糖尿病の合併症に対しても効果を有すると考えられる。

産業上の利用可能性

以上のように、本発明にかかる化合物と紅豆杉の有機溶媒抽出画分は、医薬として有用であり、特に、血糖降下剤、肝臓保護薬または抗ガン剤に適している。

請求の範囲

1. 式(1)

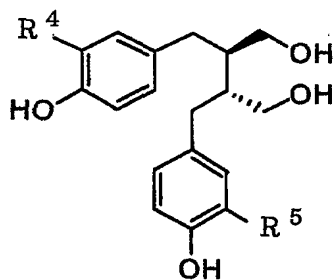


(1)

- 5 (式中R¹は水素または水酸基、R²は炭素数1～4のアルキルオキシ基または水酸基、R³は炭素数1～4のアルキルオキシ基を表す)

で示される化合物、または式(1)化合物の医学的に許容される塩またはエステルを有効成分とする医薬。

2. 式(2)

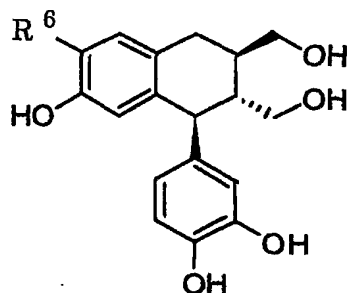


(2)

(式中R⁴、R⁵は炭素数1～4のアルキルオキシ基を表す)

で示される化合物、または式(2)化合物の医学的に許容される塩またはエステルを有効成分とする医薬。

3. 式 (3)



(3)

(式中R⁶は炭素数1～4のアルキルオキシ基を表す)

で示される化合物、または式(3)化合物の医学的に許容される塩またはエステルを有
5 効成分とする医薬。

4. 血糖降下剤、肝臓保護薬または抗ガン剤であることを特徴とする請求の範囲第1項
記載の医薬。

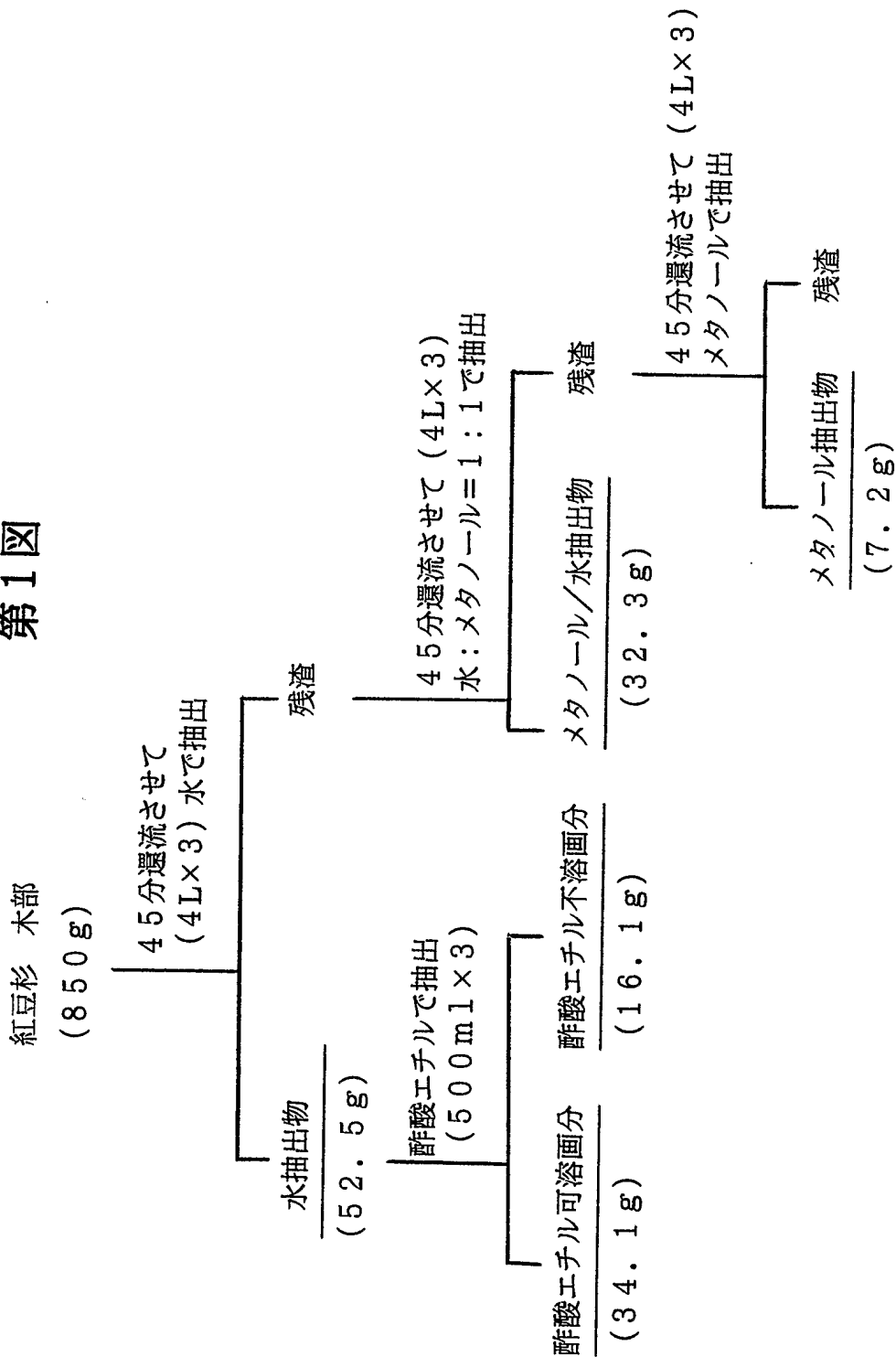
5. 血糖降下剤、肝臓保護薬または抗ガン剤であることを特徴とする請求の範囲第2項
記載の医薬。

10 6. 血糖降下剤、肝臓保護薬または抗ガン剤であることを特徴とする請求の範囲第3項
記載の医薬。

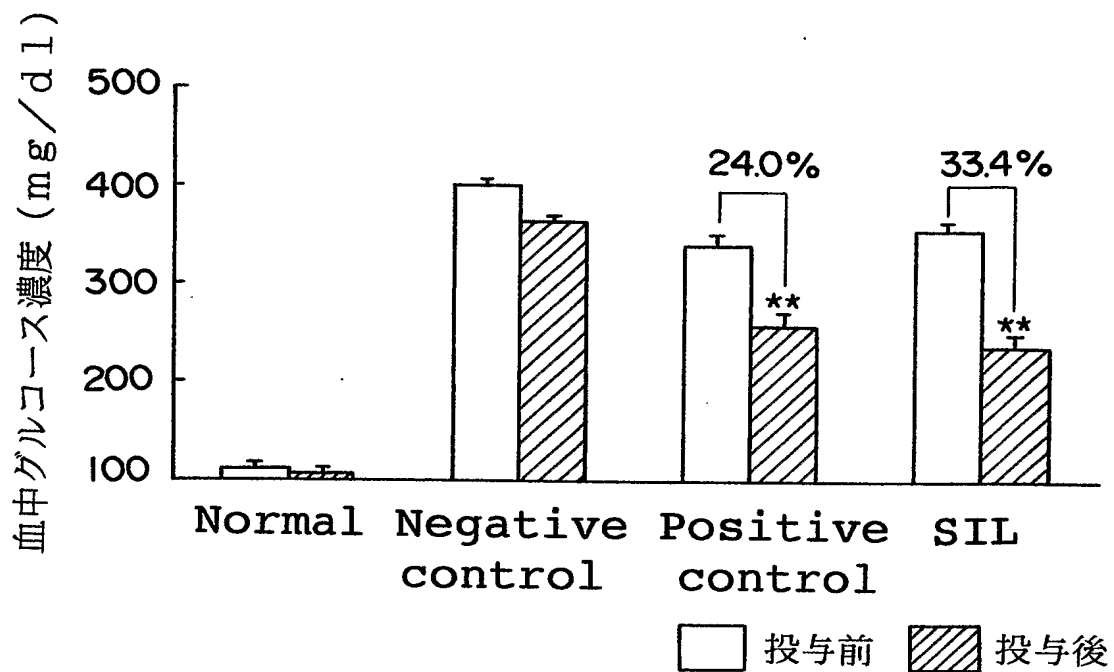
7. 紅豆杉の植物体を水で抽出し、得られた水抽出物を有機溶媒により抽出して得られ
る抽出物を有効成分とする医薬。

15 8. 血糖降下剤、肝臓保護薬または抗ガン剤であることを特徴とする請求の範囲第7項
記載の医薬。

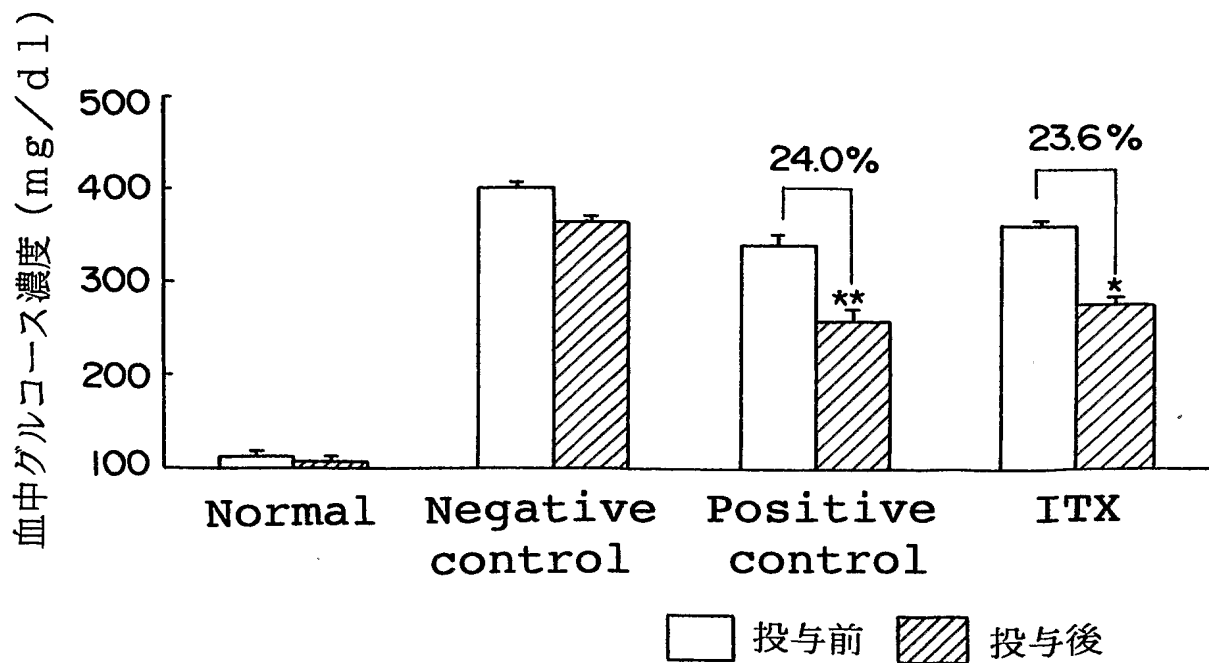
第1図



第2図

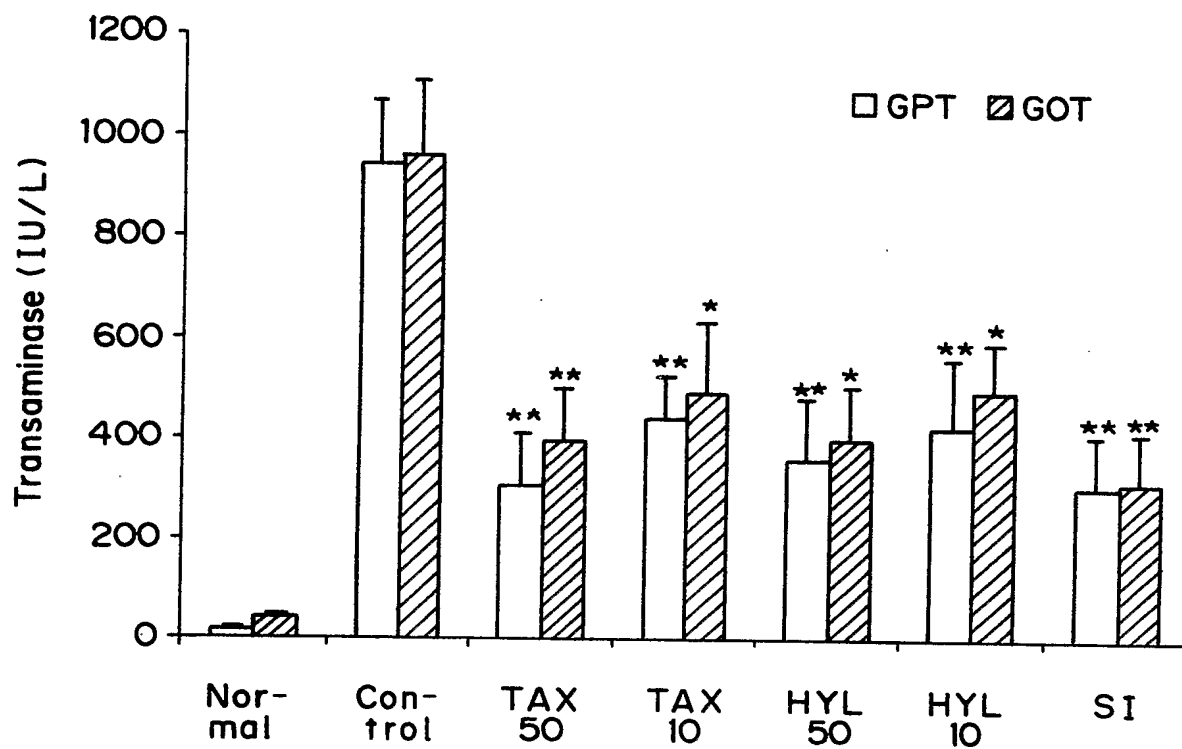


第3図

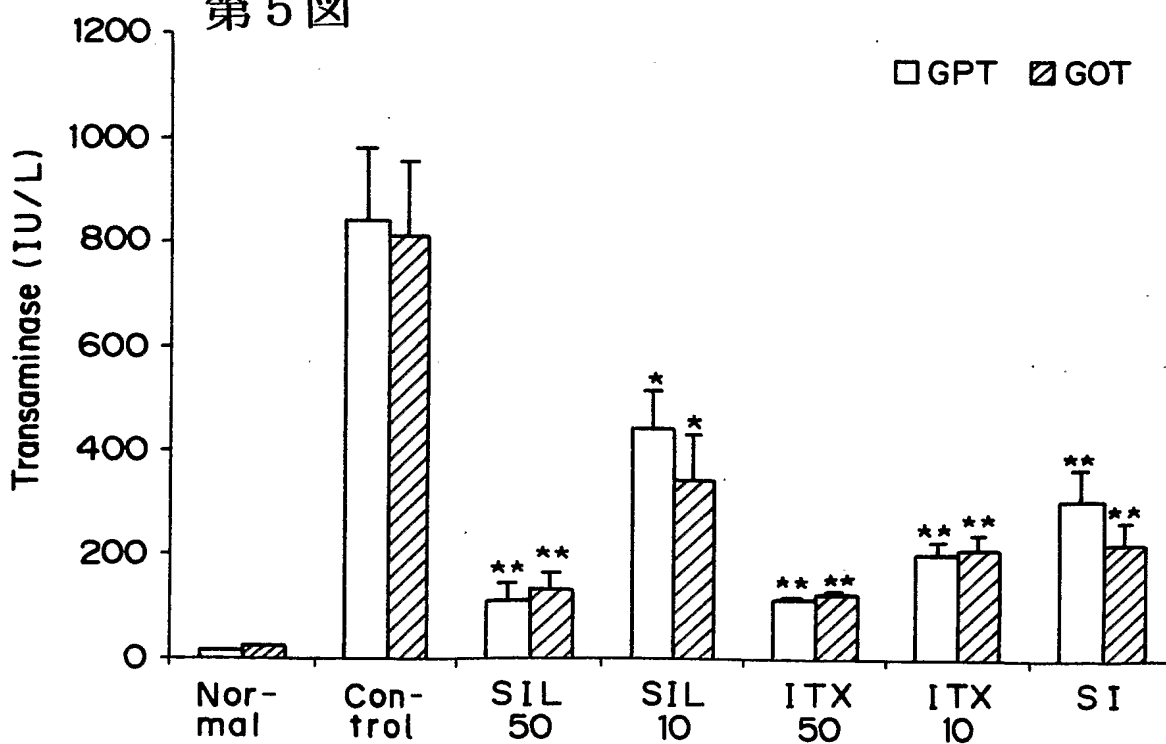


3 / 6

第4図

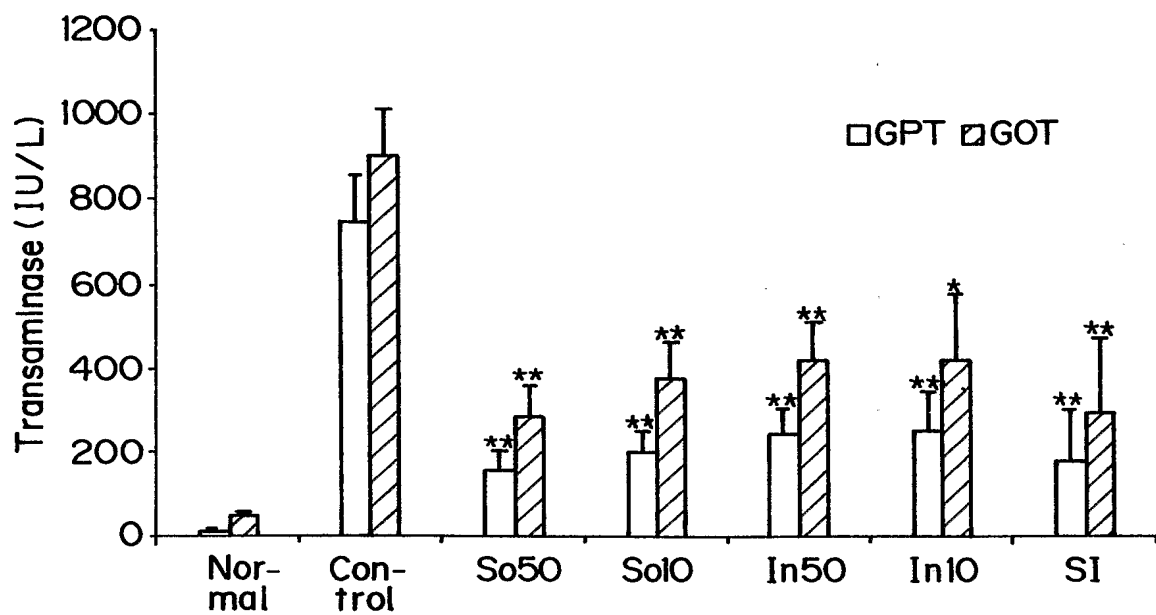


第5図



4 / 6

第 6 図

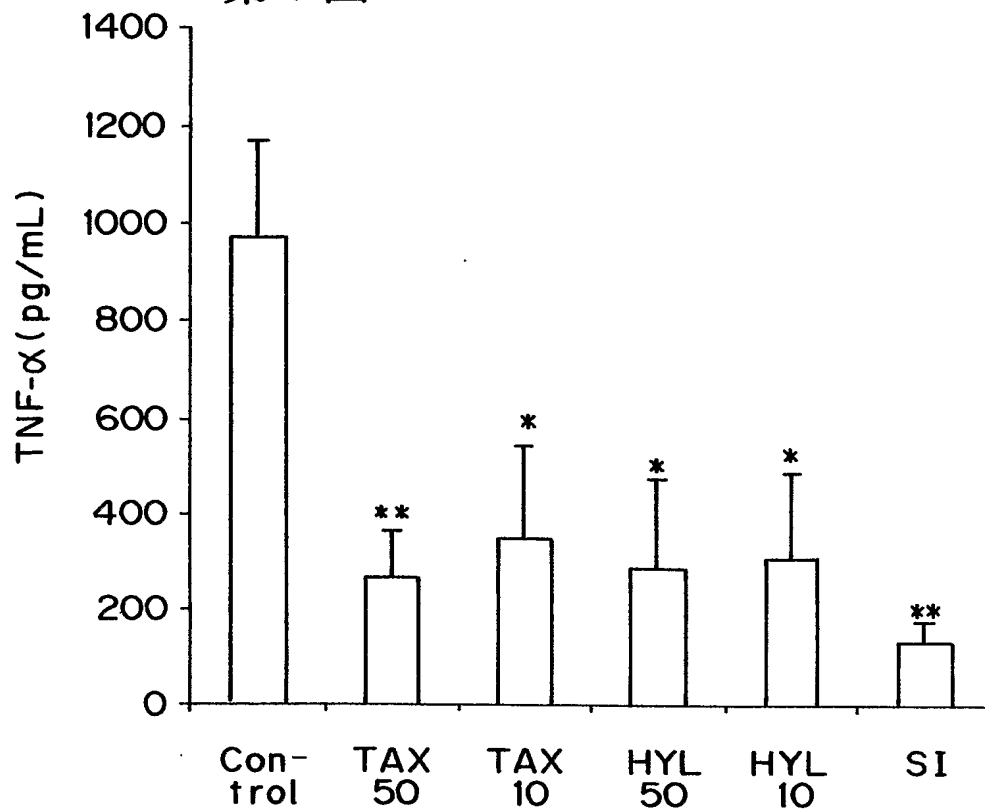


So : soluble EtOAc fraction

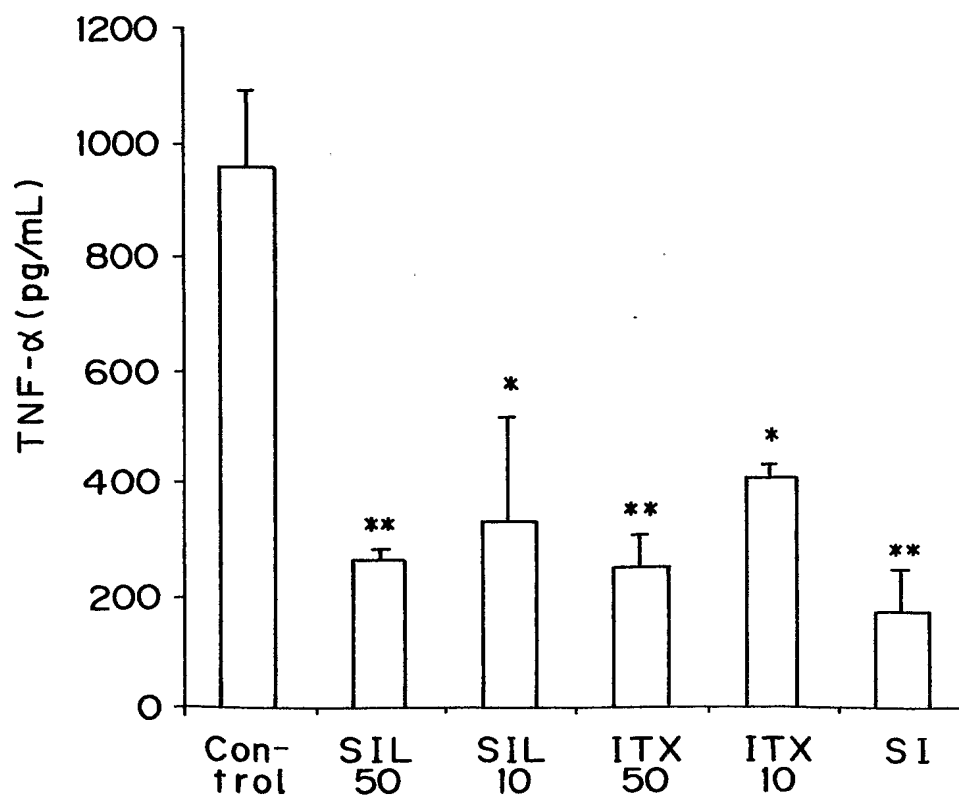
In : insoluble EtOAc fraction

5 / 6

第7図

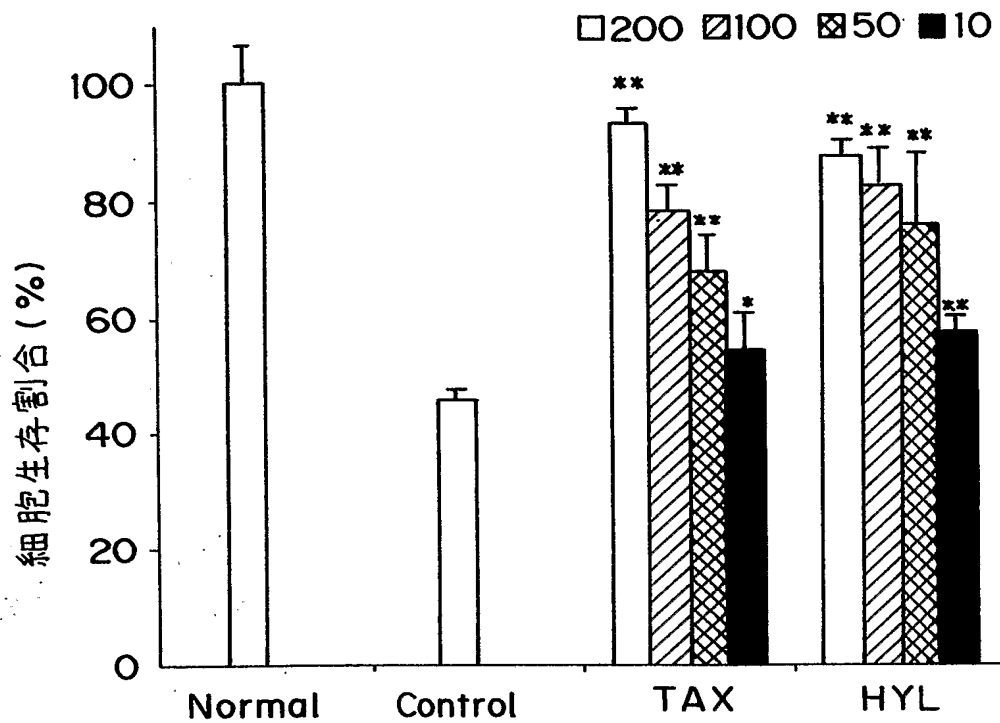


第8図

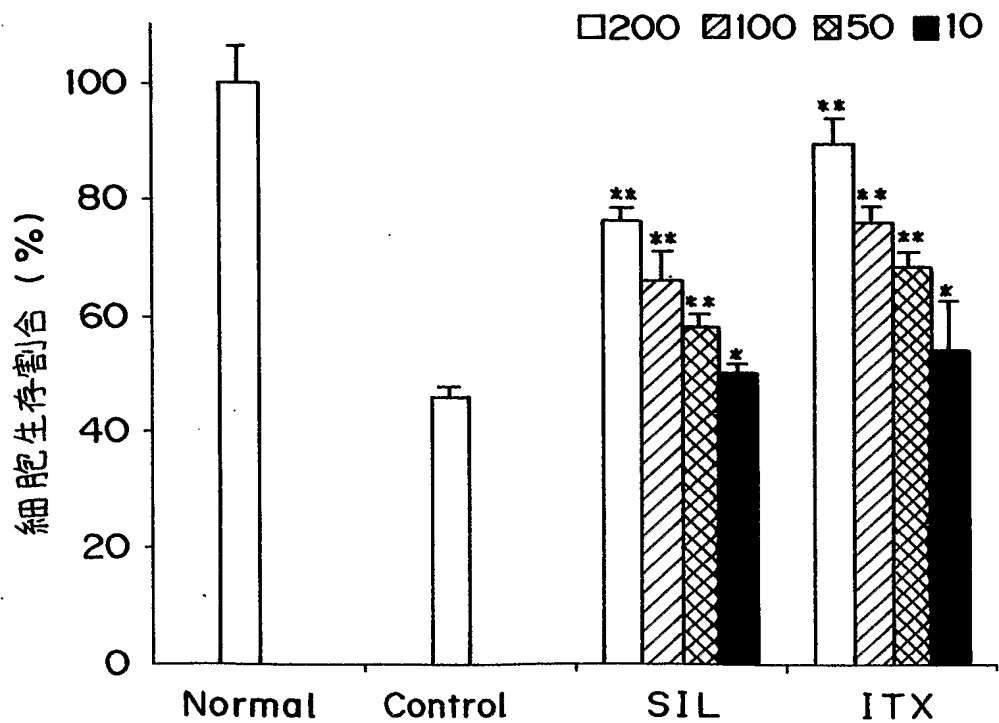


6 / 6

第 9 図



第 10 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/09370

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ A61K31/085, 31/341, 35/78, A61P1/16, 3/10, 35/00,
C07D307/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ A61K31/085, 31/341, 35/78, A61P1/16, 3/10, 35/00,
C07D307/12

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SHEN, Ya-Ching et al., "Bioactive Lignans and Toxoids from The Roots of Formosan Taxus mairei", Chinese Pharmaceutical Journal (Taipei), 1997, Vol.49, No.5-6, pages 285 to 296	1-8
X Y	JP 64-31717 A (Tsumura Juntendo Co., Ltd.), 02 February, 1989 (02.02.89), (Family: none)	2, 5 1, 3, 4, 6-8
X Y	EP 906761 A2 (ARCHER DANIELS MIDLAND Co.), 07 April, 1999 (07.04.99), & JP 11-221048 A	1, 2, 4, 5 3, 6
P, X	US 6489514 B1 (JANASWAMY Madhusudana Rao et al.), 03 December, 2002 (03.12.02), & WO 2003-20254 A1	2, 5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
10 October, 2003 (10.10.03)

Date of mailing of the international search report
04 November, 2003 (04.11.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/09370

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Chem.Abstr., Vol.121, Abstract No.292369, GUO Daih-Hung, "Hypoglycemic and antiplatelet constituents of <i>Taxus mairei</i> ", Chinese Pharmaceutical Journal (Taipei), 1994, Vol.49, No.5-6, pages 285 to 296	2, 3, 5-8 1, 4
Y	MATSUDA, Hisashi et al., "Hepatoprotective, superoxide scavenging, and antioxidative activities of aromatic constituents from the bark of <i>Betula platyphylla</i> ", Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1998, Vol.8, pages 2939 to 2944	1-8
Y	JP 9-208461 A (The Nisshin Oil Mills, Ltd.), 12 August, 1997 (12.08.97), (Family: none)	1-8
X	JP 10-120582 A (Makoto KAWAZOE), 12 May, 1998 (12.05.98), (Family: none)	7, 8
Y	Chem.Abstr., Vol.46, Abstract No.9086b-i, 9087a-b, KING F.E. et al., "Isotaxiresinol (3'-dimethylisolarciresinol), new lignan extracted from the heartwood of the Englemann yew, <i>Taxus baccata</i> ", Journal of the chemical Society, abstracts, 1952, pages 17 to 24	7, 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/09370

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(See extra sheet.)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/09370

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

In the inventions as set forth in claims 1 to 6, specific compounds are employed as various drugs such as a hypoglycemic agent. In the inventions as set forth in claims 7 and 8, on the other hand, active ingredients which are not specified by a chemical structure are used as various drugs such as a hypoglycemic agent. Thus, these two groups of inventions completely differ from each other in the technical idea concerning the active ingredients. The medicinal uses thereof are publicly known. Such being the case, there is no technical relationship between these groups of inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features and these two groups of inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept. Thus, this international application do not comply with the requirement of unity of invention.

The matter common to claims 1 to 6 resides in using compounds having the lignan skeleton as drugs. However, a compound having the lignan skeleton has been publicly known as usable as a drug for cancer, etc. Therefore, the above common matter cannot be considered as a technical feature contributing to the prior art. Such being the case, claims 1 and 4, claims 2 and 5 and claims 3 and 6 cannot be considered as having a special technical feature in common and, therefore, these groups of inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

Since there is no other common matter which is common to all claims and considered as a special technical feature, the present case has 4 groups of inventions.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ A61K31/085, 31/341, 35/78, A61P1/16, 3/10, 35/00, C07D307/12		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ A61K31/085, 31/341, 35/78, A61P1/16, 3/10, 35/00, C07D307/12		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	SHEN, Ya-Ching et. al., "Bioactive Lignans and Toxoids from The Roots of Formosan Taxus mairei", Chinese Pharmaceutical Journal (Taipei), 1997, Vol. 49, No. 5-6, p285-296	1-8
X Y	JP 64-31717 A (株式会社津村順天堂), 1989.02.02, ファミリーなし	2, 5 1, 3, 4, 6-8
X Y	EP 906761 A2 (ARCHER DANIELS MIDLAND Co.) 1999.04.07, & JP 11-221048 A	1, 2, 4, 5 3, 6
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 10.10.03	国際調査報告の発送日 2011.03	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 安藤 倫世 電話番号 03-3581-1101 内線 3492	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	US 6489514 B1 (JANASWAMY Madhusudana Rao et. al.) 2002.12.03 & WO 2003-20254 A1	2, 5
X Y	Chem. Abstr., Vol.121, 抄録番号第292369, GUO Daih-Haung, "Hypoglycemic and antiplatelet constituents of <i>Taxus mairei</i> ", Chinese Pharmaceutical Journal (Taipei), 1994, Vol.49, No.5-6, p285-296	2, 3, 5-8 1, 4
Y	MATSUDA Hisashi et.al., "Hepatoprotective, superoxide scavenging, and antioxidative activities of aromatic constituents from the bark of <i>Betula platyphylla</i> ", Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1998, Vol.8, p2939-2944	1-8
Y	JP 9-208461 A (日清製油株式会社) 1997.08.12, ファミリーなし	1-8
X	JP 10-120582 A (川添信) 1998.05.12, ファミリーなし	7, 8
Y	Chem. Abstr., Vol.46, 抄録番号第9086b-i, 9087a-b, KING F.E. et.al., "Isotaxiresinol (3'-dimethylsolariciresinol), new lignan extracted from the heartwood of the England yew, <i>Taxus baccata</i> ", Journal of the chemical Society, Abstracts, 1952, p17-24	7, 8

第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)

法第 8 条第 3 項 (PCT 17 条 (2) (a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 3 の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

別紙参照。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

・第II欄について

請求の範囲1－6の発明は特定化合物を血糖降下剤等の種々の医薬として使用するものであり、請求の範囲7及び8の発明は、化学構造によって特定されない有効成分を血糖降下剤等の種々の医薬として使用するものであるから、両者は有効成分についての技術的思想が全く異なるものである。また、両者の医薬用途自体は公知のものにすぎない。してみれば、請求の範囲1－6の発明と請求の範囲7及び8の発明の間には、一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係があるとはいえず、両者が単一の一般的発明概念を形成するように関連しているとは認められない。したがって、この国際出願は発明の単一性の要件を満たしていない。

更に、請求の範囲1－6の共通事項は、リグナン骨格を有する化合物を、医薬として用いることのみであるが、例えば文献1に記載されているとおり、リグナン骨格を有する化合物は、ガン等の医薬として用いることが公知の物質であるから、この共通事項を先行技術に対して貢献する技術的特徴と認めることはできない。してみると、請求の範囲1，4と請求の範囲2，5と請求の範囲3，6とは特別な技術的特徴を共有するものとはいえないから、これらの発明は単一の一般的発明概念を形成するように関連しているとは認められない。

また、請求の範囲全てに共通の事項であって、特別な技術的事項と考えられる他の共通事項は存在しないので、本出願に含まれる発明の数は4である。